



MORGAN L. FITCH, JR.  
FRANCIS A. EVEN\*  
JULIUS TABIN  
JOHN F. FLANNERY  
ROBERT B. JONES  
JAMES J. SCHUMANN  
JAMES J. HAMILL  
TIMOTHY E. LEVSTIK  
JOSEPH E. SHIPLEY  
KENNETH H. SAMPLES  
PHILIP T. PETTI  
JOSEPH T. NABOR  
STEVEN C. SCHROER  
RICHARD A. KABA\*  
KARL R. FINK  
MARK W. HETZLER  
TIMOTHY P. MALONEY  
JAMES P. KRUEGER  
STEPHEN S. FAVAKEH  
EDWARD W. GRAY, JR.\*  
RICHARD E. WAWRZYNIAK  
STEVEN G. PARMELEE  
SHERRI N. BLOUNT\*  
BRUCE R. MANSFIELD  
KENDREW H. COLTON\*  
G. PAUL EDGELL\*  
RICHARD W. SCHUMACHER  
MICHAEL A. SANZO\*

# FITCH, EVEN, TABIN & FLANNERY

ATTORNEYS AND COUNSELLORS AT LAW

Established in 1859

SUITE 401L - 1801 K STREET, NW  
WASHINGTON, D.C. 20006-1201

TELEPHONE (202) 419-7000  
FACSIMILE (202) 419-7007

ILLINOIS OFFICE

SUITE 1600 - 120 SOUTH LASALLE STREET, CHICAGO, ILLINOIS 60603-3406  
TELEPHONE (312) 577-7000

CALIFORNIA OFFICE

SUITE 250 - 9276 SCRANTON ROAD, SAN DIEGO, CA 92121-7707  
TELEPHONE (858) 552-1311

COLORADO OFFICE

SUITE 213 - 1942 BROADWAY, BOULDER, COLORADO 80302  
TELEPHONE (303) 402-6966

CHRISTOPHER E. GEORGE\*  
SCOTT J. MENGHINI  
EDWARD E. CLAIR  
SANDRA V. SCAVO  
JON A. BIRMINGHAM  
RUDY KRATZ  
RAMON R. HOCH\*  
JOHN E. LYHUS  
STEVEN M. FREELAND  
DONNA E. BECKER  
SEAN R. O'DOWD  
MICHAEL G. VRANICAR  
BRIAN S. CLISE  
MARTIN R. BADER  
DEREK L. PRESTIN  
MARK A. BORSOS  
DAVID R. JAGLOWSKI  
W. BRIAN EDGE\*

PATENT AGENTS

ERIC J. WHITESELL  
JONATHAN H. BACKENSTOSE  
LILIA I. SAFONOV

OF COUNSEL

THOMAS F. LEBENS  
GEORGE W. SPELLMIRE, JR.  
LISA M. SOMMER

\*ADMITTED TO D.C. BAR; D.C. PRACTICE OF  
ALL OTHERS LIMITED TO FEDERAL COURTS  
AND AGENCIES

March 11, 2004

Commissioner of Patents  
U.S. Patent and Trademark Office  
2011 South Clark Place  
Customer Window  
Crystal Plaza Two, Lobby, Room 1B03  
Arlington, VA 22202

Re: Submission of Priority Document  
Appl. No.: 10/784,914  
Filed: February 24, 2004  
Title: **Process for the Preparation of  
L-Amino Acids Using Strains of the  
Enterobacteriaceae Family**  
Inventor(s): Rieping, Mechthild  
Atty. Dkt.: 7601/80980

Dear Sir:

The following documents are being forwarded for appropriate action by the U.S. Patent and Trademark Office:

1. Submission of Priority Document in Accordance with the Requirements of Rule 55 with certified copy of DE 10 2004 003 410.9 attached; and
2. Return postcard.

Commissioner of Patents  
March 11, 2004  
Page 2

Applicant does not believe that any fee is due for the filing of these documents. However, the Commissioner is hereby authorized to charge any fee deficiency with respect to this filing and any other fee required in connection with the present case, or credit any overpayment, to our Deposit Account No. 06-1135 under Order No. 7601/80980.

It is respectfully requested that the enclosed postcard be stamped with the date the enclosed documents are received by the PTO and that it be returned as soon as possible.

Very truly yours,

FITCH, EVEN, TABIN & FLANNERY



Michael A. Sanzo  
Reg. No. 36,912  
Attorney for Applicant

MAS:ct  
Enclosures



**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

re patent application of:

Rieping, Mechthild

Appl. No.: 10/784,914

Filed: February 24, 2004

For: **Process for the Preparation of  
L-Amino Acids Using Strains of  
the Enterobacteriaceae Family**

Art Unit: to be assigned

Examiner: to be assigned

Atty. Dkt.: 7601/80980

**Submission of Priority Document  
in Accordance with the Requirements of Rule 55**

Commissioner of Patents  
U.S. Patent and Trademark Office  
2011 South Clark Place  
Customer Window  
Crystal Plaza Two, Lobby, Room 1B03  
Arlington, VA 22202

Sir:

Please accept the enclosed certified copy of priority documents DE 10 2004 003 410.9, filed on January 23, 2004, for which benefit under 35 U.S.C. § 119/365 is being claimed in the above-captioned application. In the event priority to the enclosed foreign application has not been claimed, it is claimed hereby.

Respectfully submitted,

FITCH, EVEN, TABIN & FLANNERY

By *Michael A. Sanzo*

Michael A. Sanzo

Reg. No. 36,912

Attorney for Applicant

Date March 11, 2004  
1801 K Street, N.W., Suite 401L  
Washington, DC 20006-1201  
Phone: (202) 419-7013

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 10 2004 003 410.9  
**Anmeldetag:** 23. Januar 2004  
**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG,  
40474 Düsseldorf/DE  
**Bezeichnung:** Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren  
unter Verwendung von Stämmen der Familie  
Enterobacteriaceae  
**IPC:** C 12 N 1/21

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 26. Februar 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Klostermann", is placed over the typed name of the President.

Klostermann

**Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae**

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung 5 von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae, in denen das eno-Gen verstärkt wird.

**Stand der Technik**

L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der 10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, dass L-Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen der Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli (E. coli) und Serratia marcescens, hergestellt werden. 15 Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der 20 Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser 25 Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das Threonin-Analogon  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Hydroxyvaleriansäure (AHV) oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und 30 L-Aminosäuren wie z.B. L-Threonin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Aminosäuren produzierender Stämme der Familie

Enterobacteriaceae eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion untersucht. Zusammenfassende Informationen zur Zell- und Molekularbiologie von

5 Escherichia coli und Salmonella sind in Neidhardt (ed): Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, 2<sup>nd</sup> Edition, ASM Press, Washington, D.C., USA, (1996) zu finden.

#### Aufgabe der Erfindung

10 Aufgabe der Erfindung ist es, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, bereitzustellen.

#### Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung  
15 von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Aminosäuren produzieren, und in denen mindestens die für das eno-Gen kodierende Nukleotidsequenz oder dessen Allele verstärkt  
20 wird bzw. werden.

Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Threonin.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität oder  
30 Konzentration eines oder mehrerer Enzyme oder Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene um mindestens eine (1) Kopie erhöht,

einen starken Promotor oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym oder Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

- 5 Durch die Maßnahmen der Verstärkung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder
- 10 Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht. Als Ausgangs-Mikroorganismus wird der Mikroorganismus verstanden, an dem die erfinderischen Maßnahmen durchgeführt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man das eno-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen oder Allele verstärkt, in einem Medium unter Bedingungen geeignet für die Bildung des eno-Genproduktes,
- b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
- c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen ( $> 0$  bis 100%) davon im Produkt verbleiben oder vollständig entfernt werden.

Die insbesondere rekombinanten Mikroorganismen, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, gegebenenfalls Stärke, gegebenenfalls Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol

herstellen. Es handelt sich um Vertreter der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei 5 der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

Rekombinante Mikroorganismen werden durch Transformation, Konjugation oder Transduktion mit die gewünschte Gene 10 tragenden Vektoren hergestellt.

Geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Escherichia, insbesondere der Art Escherichia coli sind beispielsweise

- Escherichia coli H4581 (EP 0 301 572)
- 15 - Escherichia coli KY10935 (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61(11):1877-1882 (1997))
- Escherichia coli VNIIgenetika MG442 (US-A-4278,765)
- Escherichia coli VNIIgenetika M1 (US-A-4,321,325)
- Escherichia coli VNIIgenetika 472T23 (US-A-5,631,157)
- 20 - Escherichia coli BKIIM B-3996 (US-A-5,175,107)
- Escherichia coli kat 13 (WO 98/04715)
- Escherichia coli KCCM-10132 (WO 00/09660).

Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Serratia, insbesondere der Art Serratia marcescens sind 25 beispielsweise

- Serratia marcescens HNr21 (Applied and Environmental Microbiology 38(6): 1045-1051 (1979))

- *Serratia marcescens* TLr156 (Gene 57(2-3): 151-158 (1987))
- *Serratia marcescens* T-2000 (Applied Biochemistry and Biotechnology 37(3): 255-265 (1992)).

5 L-Threonin produzierende Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae besitzen bevorzugt, unter anderen, ein oder mehrere der genetischen bzw. phänotypischen Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: Resistenz gegen  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Hydroxyvaleriansäure, Resistenz gegen Thialysin, Resistenz

10 gegen Ethionin, Resistenz gegen  $\alpha$ -Methylserin, Resistenz gegen Diaminobernsteinsäure, Resistenz gegen  $\alpha$ -Aminobuttersäure, Resistenz gegen Borreolidin, Resistenz gegen Cyclopentan-Carboxylsäure, Resistenz gegen Rifampicin, Resistenz gegen Valin-Analoga wie

15 beispielsweise Valinhydroxamat, Resistenz gegen Purinanaloga wie beispielsweise 6-Dimethylaminopurin, Bedürftigkeit für L-Methionin, gegebenenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin, Bedürftigkeit für meso-Diaminopimelinsäure, Auxotrophie bezüglich

20 Threonin-haltiger Dipeptide, Resistenz gegen L-Threonin, Resistenz gegen Threonin-Raffinat, Resistenz gegen L-Homoserin, Resistenz gegen L-Lysin, Resistenz gegen L-Methionin, Resistenz gegen L-Glutaminsäure, Resistenz gegen L-Aspartat, Resistenz gegen L-Leucin, Resistenz gegen L-

25 Phenylalanin, Resistenz gegen L-Serin, Resistenz gegen L-Cystein, Resistenz gegen L-Valin, Empfindlichkeit gegenüber Fluoropyruvat, defekte Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Verstärkung des Threonin-Operons, Verstärkung der

30 Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I bevorzugt der feed back resistenten Form, Verstärkung der Homoserinkinase, Verstärkung der Threoninsynthase, Verstärkung der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Aspartatsemialdehyd-

35 Dehydrogenase, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-

Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Verstärkung der Transhydrogenase, Verstärkung des RhtB-Genproduktes, Verstärkung des RhtC-Genproduktes, Verstärkung des YfiK-  
5 Genproduktes, Verstärkung einer Pyruvat-Carboxylase, und Abschwächung der Essigsäurebildung.

Es wurde gefunden, dass Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Verstärkung, insbesondere Überexpression des eno-Gens, in verbesserter Weise L-  
10 Aminosäuren, insbesondere L-Threonin produzieren.

Die Nukleotidsequenzen der Gene von *Escherichia coli* gehören zum Stand der Technik (Siehe nachfolgende Textstellen) und können ebenfalls der von Blattner et al. (Science 277: 1453-1462 (1997)) publizierten Genomsequenz  
15 von *Escherichia coli* entnommen werden.

Das eno-Gen wird unter anderem durch folgende Angaben beschrieben:

Bezeichnung: Enolase, Phosphopyruvate Hydratase  
Funktion: Enolisierung (Wasserabspaltung):  
20 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat  
in der Glycolyse  
EC-Nr.: EC 4.2.1.11  
Referenz: Spring TG. und Wold F.; The Journal of  
Biological Chemistry 246(22): 6797-6802  
25 (1971)  
Klein et al.; DNA Sequence 6(6): 351-355  
(1996)  
Gulick et al.; Biochemistry 40(51): 15716 -  
15724 (2001)  
30 Kaga et al.; Bioscience, Biotechnology and  
Biochemistry 66(10): 2216-2220 (2002)

Accession No.: AE000361

Das eno-Gen von *Salmonella typhimurium* wird unter anderem in folgender Referenz beschrieben: Garrido-Pertierra A.; Revista Espanola de Fisiologia 36(1): 33-39 (1980).

Die Nukleinsäuresequenzen können den Datenbanken des  
5 National Center for Biotechnology Information (NCBI) der  
National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), der  
Nukleotidsequenz-Datenbank der European Molecular Biologies  
Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland bzw. Cambridge,  
UK) oder der DNA Datenbank von Japan (DDBJ, Mishima, Japan)  
10 entnommen werden.

Der besseren Übersichtlichkeit halber sind die  
Nukleotidsequenz des eno-Gens und die Aminosäuresequenz des  
Genproduktes von *Escherichia coli* als SEQ ID NO:3 und 4  
wiedergegeben.

15 Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen Gene  
können erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können  
Allele der Gene verwendet werden, die sich aus der  
Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch  
funktionsneutrale Sinnmutationen („sense mutations“)  
20 ergeben. Die Verwendung endogener Gene wird bevorzugt.

Unter „endogenen Genen“ oder „endogenen Nukleotidsequenzen“  
versteht man die in der Population einer Art vorhandenen  
Gene oder Allele beziehungsweise Nukleotidsequenzen.

Zu den geeigneten Allelen des eno-Gens gehören solche,  
25 welche funktionsneutrale Mutationen bzw. Sinnmutationen  
(„sense mutations“) enthalten. Hierzu zählen unter anderem  
solche, die zu mindestens einem (1) konservativen  
Aminosäureaustausch in dem von ihnen kodierten Protein  
führen. Die maximale Anzahl an konservativen  
30 Aminosäureaustauschen kann 2, 3, 5, 10, 20, in keinem Fall  
aber mehr als 30 Aminosäuren betreffen. Durch die genannten  
konservativen Aminosäureaustausche wird die

Funktionsfähigkeit um 0% bis maximal 24%, 20%, 10%, 5%, 3%, 2% oder 1% erniedrigt oder erhöht.

Bei den aromatischen Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Phenylalanin, Tryptophan und 5 Tyrosin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den hydrophoben Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Leucin, Isoleucin und Valin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den polaren Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Glutamin und 10 Aparagin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den basischen Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Arginin, Lysin und Histidin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den sauren Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Asparaginsäure und 15 Glutaminsäure gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den Hydroxyl-Gruppen enthaltenden Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Serin und Threonin gegeneinander ausgetauscht werden. Alle übrigen Aminosäureaustausche werden als nicht-konservative 20 Aminosäureaustausche bezeichnet.

In gleicher Weise können auch solche Nukleotidsequenzen verwendet werden, die für Varianten der genannten Proteine kodieren, die zusätzlich am N- oder C-Terminus eine Verlängerung oder Verkürzung um mindestens eine (1) 25 Aminosäure enthalten. Diese Verlängerung oder Verkürzung beträgt nicht mehr als 50, 40, 30, 20, 10, 5, 3 oder 2 Aminosäuren oder Aminosäurereste.

Zu den geeigneten Allelen zählen auch solche, die für Proteine kodieren, in denen mindestens eine (1) Aminosäure 30 eingefügt (Insertion) oder entfernt (Deletion) ist. Die maximale Anzahl derartige als Indels bezeichneter Veränderungen kann 2, 3, 5, 10, 20 in keinem Falle aber mehr als 30 Aminosäuren betreffen.

Zu den geeigneten Allelen gehören ferner solche die durch Hybridisierung, insbesondere unter stringenten Bedingungen unter Verwendung von SEQ ID No. 3 oder Teilen davon insbesondere der Kodierregionen bzw. der dazu

5 komplementären Sequenzen, erhältlich sind.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH

10 (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.

(International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heißt, es werden nur Hybride

gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit 15 der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70%

identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschritte durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die

20 Hybridisierungsreaktion wird im Allgemeinen bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschritten durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein

25 Puffer entsprechend 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter

30 stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine

35 Temperatur von ca. 50°C - 68°C, ca. 52°C - 68°C, ca. 54°C -

68°C, ca. 56°C – 68°C, ca. 58°C – 68°C, ca. 60°C – 68°C,  
ca. 62°C – 68°C, ca. 64°C – 68°C, ca. 66°C – 68°C  
eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die  
Salzkonzentration bis auf eine Konzentration entsprechend  
5 0,2x SSC oder 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise  
Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca.  
1 – 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente  
isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder  
mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% oder mindestens  
10 96% bis 99% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde  
besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in  
Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy  
Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,  
Deutschland, Catalog No. 1603558).

15 Zur Erzielung einer Verstärkung können beispielsweise die  
Expression der Gene oder die katalytischen Eigenschaften  
der Enzymproteine erhöht werden. Gegebenenfalls können  
beide Maßnahmen kombiniert werden.  
So kann beispielsweise die Kopienzahl der entsprechenden  
20 Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und  
Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die  
sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert  
werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die  
stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch  
25 induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die  
Expression im Verlaufe der fermentativen L-Threonin-  
Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung  
der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression  
verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus  
30 des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt.  
Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden  
mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im  
Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann  
weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch

Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Chang und Cohen (Journal of Bacteriology 134: 1141-1156 5 (1978)), bei Hartley und Gregori (Gene 13: 347-353 (1981)), bei Amann und Brosius (Gene 40: 183-190 (1985)), bei de Broer et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 21-25 (1983)), bei LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11: 187-193 (1993)), in 10 PCT/US97/13359, bei Llosa et al. (Plasmid 26: 222-224 (1991)), bei Quandt und Klipp (Gene 80: 161-169 (1989)), bei Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)) und in bekannten 15 Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

In Enterobacteriaceae replizierbare Plasmidvektoren wie z.B. von pACYC184 abgeleitete Kloniervektoren (Bartolomé et al.; Gene 102: 75-78 (1991)), pTrc99A (Amann et al.; Gene 69: 301-315 (1988)) oder pSC101-Derivate (Vocke und Bastia; 20 Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80(21): 6557-6561 (1983)) können verwendet werden. In einem erfindungsgemäßen Verfahren kann man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzen, wobei der Plasmidvektor mindestens eine für das eno-Gen kodierende 25 Nukleotidsequenz oder Allel trägt.

Unter dem Begriff Transformation versteht man die Aufnahme einer isolierten Nukleinsäure durch einen Wirt (Mikroorganismus).

Es ist ebenfalls möglich, Mutationen, die die Expression 30 der jeweiligen Gene betreffen, durch Sequenzaustausch (Hamilton et al.; Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

Nähere Erläuterungen zu den Begriffen der Genetik und Molekularbiologie findet man in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie beispielsweise dem Lehrbuch von Birge (Bacterial and Bacteriophage Genetics, 5 4<sup>th</sup> ed., Springer Verlag, New York (USA), 2000) oder dem Lehrbuch von Berg, Tymoczko and Stryer (Biochemistry, 5<sup>th</sup> ed., Freeman and Company, New York (USA), 2002) oder dem Handbuch von Sambrook et al. (Molekular Cloning, A Laboratory Manual, (3-Volume Set), Cold Spring Harbor 10 Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001).

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin mit Stämmen der Familie Enterobacteriaceae vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des eno-Gens, ein oder mehrere Enzyme des 15 bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzyme des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme für die Produktion von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat oder Enzyme der Glykolyse oder PTS-Enzyme oder Enzyme des Schwefelstoffwechsels zu verstärken. Die 20 Verwendung endogener Gene wird im allgemeinen bevorzugt.

So können beispielsweise gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende 25 thrABC-Operon (US-A-4,278,765),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen von Corynebacterium glutamicum (WO 99/18228),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen (Molecular and General Genetics 231(2): 332-336 30 (1992)),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen ((WO 02/064808),

- die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1986)),
- das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB  
5 (EP-A-0 994 190),
- das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC (EP-A-1 013 765),
- das für das Threoninexport-Protein kodierende thrE-Gen von Corynebacterium glutamicum (WO 01/92545),
- 10 • das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983)),
- das für die Phosphoglucomutase kodierende pgm-Gen (WO 03/004598),
- 15 • das für die Fructose Biphosphat Aldolase kodierende fba-Gen (WO 03/004664),
- das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-Phosphotransferase des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende ptsH-Gen des ptsHICrr-Operons (WO 03/004674),
- 20 • das für das Enzym I des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende ptsI-Gen des ptsHICrr-Operons (WO 03/004674),
- das für die Glucose-spezifische IIA Komponente des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende crr-Gen des ptsHICrr-Operons (WO 03/004674),
- 25 • das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente kodierende ptsG-Gen (WO 03/004670),
- das für den Regulator des Leucin-Regulons kodierende lrp-Gen (WO 03/004665),

- das für den Regulator des fad-Regulons kodierende fadR-Gen (WO 03/038106),
- das für den Regulator des zentralen Intermediärstoffwechsels kodierende iclR-Gen 5 (WO 03/038106),
- das für die kleine Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpC-Gen des ahpCF-Operons (WO 03/004663),
- das für die große Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpF-Gen des ahpCF-Operons 10 (WO 03/004663),
- das für die Cystein-Synthase A kodierende cysK-Gen (WO 03/006666),
- das für den Regulator des cys-Regulons kodierende cysB-Gen 15 (WO 03/006666),
- das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysJ-Gen des cysJIH-Operons (WO 03/006666),
- das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysI-Gen des cysJIH-Operons (WO 03/006666),
- 20 • das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende cysH-Gen des cysJIH-Operons (WO 03/006666),
- das für ein Membranprotein mit anti-sigmaE-Aktivität kodierende rseA-Gen des rseABC-Operons (WO 03/008612),
- das für einen globalen Regulator des sigmaE-Faktors 25 kodierende rseC-Gen des rseABC-Operons (WO 03/008612),
- das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008614),

- das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucB-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008614),
- das für die  $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase 5 kodierende sucC-Gen des suc ABCD-Operons (WO 03/008615),
- das für die  $\alpha$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucD-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008615),
- das für die E1-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceE-Gen (WO 03/076635),
- das für die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceF-Gen (WO 03/076635), und
- das für den Regulator der SigmaE-Faktor-Aktivität 10 kodierende rseB-Gen (Molecular Microbiology 24(2): 355-371 (1997))

15 verstärkt werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des eno-Gens, eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen (Journal of Bacteriology 169: 4716-4721 (1987)),
- das für die Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37) 20 kodierende mdh-Gen (Archives in Microbiology 149: 36-42 (1987)),
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa (Accession Number AAC77180 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), 25 WO 02/29080),

- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) *ytfP* (Accession Number AAC77179 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), WO 02/29080),
- 5 • das für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende *pckA*-Gen (WO 02/29080),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende *poxB*-Gen (WO 02/36797),
- das für den *DgsA*-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende *dgsA*-Gen (WO 02/081721), das auch unter der Bezeichnung *mlc*-Gen bekannt ist,
- 10 • das für den Fructose-Repressor kodierende *fruR*-Gen (WO 02/081698), das auch unter der Bezeichnung *cra*-Gen bekannt ist,
- 15 • das für den Sigma<sup>38</sup>-Faktor kodierende *rpoS*-Gen (WO 01/05939), das auch unter der Bezeichnung *katF*-Gen bekannt ist, und
- das für die Aspartat Ammonium-Lyase kodierende *aspA*-Gen (WO 03/008603)
- 20 abzuschwächen, insbesondere auszuschalten oder die Expression zu verringern.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder

- 25 mehrerer Enzyme oder Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das
- 30 entsprechende Enzym (Protein) oder Gen inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-  
5 Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des eno-Gens, unerwünschte Nebenreaktionen  
10 auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können im  
15 batch - Verfahren (Satzkultivierung), im fed batch (Zulaufverfahren) oder im repeated fed batch-Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die  
20 Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise  
25 den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen.

Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

30 Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und gegebenenfalls Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und

Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- 5 Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und
- 10 Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden.

- 15 Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden.
- 20 Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.
- 25 Die Fermentation wird im allgemeinen bei einem pH-Wert von 5,5 bis 9,0, insbesondere 6,0 bis 8,0, durchgeführt. Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure
- 30 oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika
- 35 hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen

aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 25°C bis 45°C und vorzugsweise bei 30°C bis 40°C. Die 5 Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Aminosäuren bzw. L-Threonin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch  
10 Anionenaustauschchromatographie mit anschließender  
Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et  
al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958))  
beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC  
erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry  
15 51: 1167-1174 (1979)) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen  
Herstellung von L-Aminosäuren, wie beispielsweise L-  
Threonin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin  
und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

20 Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand von  
Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Verwendete Minimal- (M9) und Vollmedien (LB) für  
Escherichia coli sind von J.H. Miller (A Short Course in  
Bacterial Genetics (1992), Cold Spring Harbor Laboratory  
25 Press) beschrieben. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus  
Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion,  
Ligation, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung  
werden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning - A  
Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory  
30 Press) durchgeführt. Die Transformation von Escherichia  
coli wird, wenn nicht anders beschrieben, nach Chung et al.  
(Proceedings of the National Academy of Sciences of the  
United States of America 86: 2172-2175 (1989))  
durchgeführt.

Die Bebrütungstemperatur bei der Herstellung von Stämmen und Transformanten ist 37°C.

Beispiel 1

Konstruktion des Expressionsplasmides pTrc99Aeno

5. Das eno-Gen aus E. coli K12 wird unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert. Ausgehend von der Nukleotidsequenz des eno-Gens in E. coli K12 MG1655 (Accession Number AE000361, Blattner et al. (Science 277: 1453-1474 (1997)) werden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland). Die Primer enthalten Sequenzen für Restriktionsenzyme, die in der unten dargestellten Nukleotidabfolge durch Unterstrichen markiert sind. Der Primer eno1 enthält die
- 10 Restriktionsschnittstelle für XbaI, der Primer eno2 die für HindIII.
- 15

eno1:

5' - GTTTGTCTAGAGTTTCAGTTAACTAGTGAC - 3' (SEQ ID No. 1)

eno2:

20 5' - CCGGAGGCTGGCAAGCTTAAATCAG - 3' (SEQ ID No. 2)

Die für die PCR eingesetzte chromosomale E. coli K12 MG1655 DNA wird nach Herstellerangaben mit „Qiagen Genomic-tips 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 1381 bp großes DNA-Fragment kann mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) mit der Vent-DNA-Polymerase (New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland) amplifiziert werden (SEQ ID No. 3).

30 Das amplifizierte eno-Fragment wird mit den Restriktionsenzymen HindIII und XbaI restriktiert und nach Aufreinigung (Purification Kit, QIAGEN, Hilden,

Deutschland) in einem 0,8%igen Agarosegel überprüft. Der Vektor pTrc99A (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) wird mit den Enzymen HindIII und XbaI gespalten, und mit dem restriktionsenzymeren eno-Fragment ligiert. Der E. coli Stamm

5 TOP10 One Shot (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Niederlande) wird mit dem Ligationsansatz transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt ist, selektioniert. Die erfolgreiche Klonierung kann nach der Plasmid DNA Isolierung durch die

10 Kontrollspaltung mit den Enzymen HindIII/XbaI und PvuI nachgewiesen werden. Das Plasmid wird als pTrc99Aeno (Figur 1) bezeichnet.

#### Beispiel 2

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442/pTrc99Aeno

15 Der L-Threonin produzierende E. coli Stamm MG442 ist in der Patentschrift US-A- 4,278,765 beschrieben und bei der Russischen Nationalsammlung für industrielle Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland) als CMIM B-1628 hinterlegt.

20 Der Stamm MG442 wird mit dem in Beispiel 1 beschriebenen Expressionsplasmid pTrc99Aeno und mit dem Vektor pTrc99A transformiert und auf LB Agar mit 50 µg/ml Ampicillin Plasmid tragende Zellen selektioniert. Die erfolgreichen Transformationen können nach der Plasmid DNA Isolierung

25 durch die Kontrollspaltungen mit den Enzymen HindIII/XbaI bestätigt werden. Auf diese Weise entstehen die Stämme MG442/pTrc99Aeno und MG442/pTrc99A. Ausgewählte Einzelkolonien werden anschließend auf Minimalmedium mit der folgenden Zusammensetzung: 3,5 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,5 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 g/l Glucose, 20 g/l Agar, 50 mg/l Ampicillin, weiter vermehrt. Die Bildung von L-Threonin wird in batch Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeierkolben enthalten sind, überprüft. Dazu wird 10 ml Vorkulturmedium der folgenden Zusammensetzung: 2 g/l

Hefeextrakt, 10 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15 g/l  $\text{CaCO}_3$ , 20 g/l Glucose, 50 mg/l Ampicillin, beimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, 5 Schweiz) inkubiert.

Je 250  $\mu\text{l}$  dieser Vorkultur werden in 10 ml Produktionsmedium (25 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,03 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,018 g/l  $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ , 30 g/l  $\text{CaCO}_3$ , 20 g/l Glucose, 50 mg/l Ampicillin) überimpft und 10 für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur vollständigen Induktion der Expression des eno-Gens wird in Parallelansätzen 100 mg/l Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) hinzugefügt. Die Bildung von L-Threonin durch den Ausgangsstamm MG442 wird in der gleichen 15 Weise überprüft, wobei jedoch keine Zugabe von Ampicillin zum Medium erfolgt. Nach der Inkubation wird die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Düsseldorf, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 660 nm bestimmt.

20 Anschließend wird die Konzentration an gebildetem L-Threonin im steril filtrierten Kulturüberstand mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt.

25 In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	Zusätze	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442	-	5,6	1,4
MG442/pTrc99A	-	3,8	1,3
MG442/pTrc99Aeno	-	2,6	1,7
MG442/pTrc99Aeno	IPTG	5,1	2,6

## Kurze Beschreibung der Figur:

Längenangaben sind als ca.-Angaben aufzufassen. Die

5 verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:

- Amp: Ampicillinresistenzgen
- lacI: Gen für das Repressorprotein des trc-Promotors
- P<sub>trc</sub>: trc-Promotorregion, IPTG-induzierbar
- 10 • eno: Kodierregion des eno-Gens
- 5S: 5S rRNA-Region
- rrnBT: rRNA-Terminator-Region

Die Abkürzungen für die Restriktionsenzyme haben folgende Bedeutung

15 • HindIII: Restriktionsendonuklease aus *Haemophilus influenzae* R<sub>c</sub>

• PvuI Restriktionsendonuklease aus *Proteus vulgaris*

- XbaI: Restriktionsendonuklease aus *Xanthomonas campestris*

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt:
  - 5 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man das eno-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen oder Allele verstärkt,
  - 10 b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
  - 15 c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen ( $> 0$  bis 100%) davon im Produkt verbleiben.
- 20 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
- 25 3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Expression des (der) Polynukleotids (e), das (die) für das eno-Gen kodiert (kodieren), erhöht.
- 30 5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die regulatorischen und/oder katalytischen

Eigenschaften des Polypeptids (Proteins) verbessert oder erhöht, für das das Polynukleotid eno kodiert.

6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung von L-Aminosäuren  
5 Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

10 6.1 das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon,

6.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen,

6.3 das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen,

15 6.4 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen,

6.5 die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB,

6.6 das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB,

20 6.7 das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC,

6.8 das für das Threoninexport-Protein kodierende thrE-Gen,

6.9 das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen,

25 6.10 das für die Phosphoglucomutase kodierende pgm-Gen,

6.11 das für die Fructose Biphosphat Aldolase kodierende fba-Gen,

6.12 das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-  
Phosphotransferase kodierende ptsH-Gen,

6.13 das für das Enzym I des Phosphotransferase-  
Systems kodierende ptsI-Gen,

5 6.14 das für die Glucose-spezifische IIA Komponente  
kodierende crr-Gen,

6.15 das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente  
kodierende ptsG-Gen,

6.16 das für den Regulator des Leucin-Regulons  
kodierende lrp-Gen,

10 6.17 das für den Regulator des fad-Regulons  
kodierende fadR-Gen,

6.18 das für den Regulator des zentralen  
Intermediärstoffwechsels kodierende iclR-Gen,

15 6.19 das für die kleine Untereinheit der Alkyl  
Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpC-Gen,

6.20 das für die große Untereinheit der Alkyl  
Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpF-Gen,

20 6.21 das für die Cystein-Synthase A kodierende cysK-  
Gen,

6.22 das für den Regulator des cys-Regulons  
kodierende cysB-Gen,

6.23 das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-  
Reduktase kodierende cysJ-Gen,

25 6.24 das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-  
Reduktase kodierende cysI-Gen,

6.25 das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende  
cysH-Gen,

6.26 das für ein Membranprotein mit anti-sigmaE-Aktivität kodierende rseA-Gen,

6.27 das für einen globalen Regulator des sigmaE-Faktors kodierende rseC-Gen

5 6.28 das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen,

6.29 das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucB-Gen,

10 6.30 das für die  $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucC-Gen,

6.31 das für die  $\alpha$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucD-Gen,

15 6.32 das für die E1-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceE-Gen,

6.33 das für die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceF-Gen, und

20 6.34 das für den Regulator der SigmaE-Faktor-Aktivität kodierende rseB-Gen

verstärkt.

7. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung von L-Aminosäuren Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

25 7.1 das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen,

7.2 das für die Malat-Dehydrogenase kodierende mdh-Gen,

7.3 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa,

5 7.4 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP,

7.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen,

7.6 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen,

10 7.7 das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen,

7.8 das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen,

15 7.9 das für den Sigma<sup>38</sup>-Faktor kodierende rpoS-Gen und

7.10 das für die Aspartat Ammonium-Lyase kodierende aspA-Gen

20 abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die Expression verringert.

8. Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, insbesondere der Gattung Escherichia, in denen das eno-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt vorliegt.

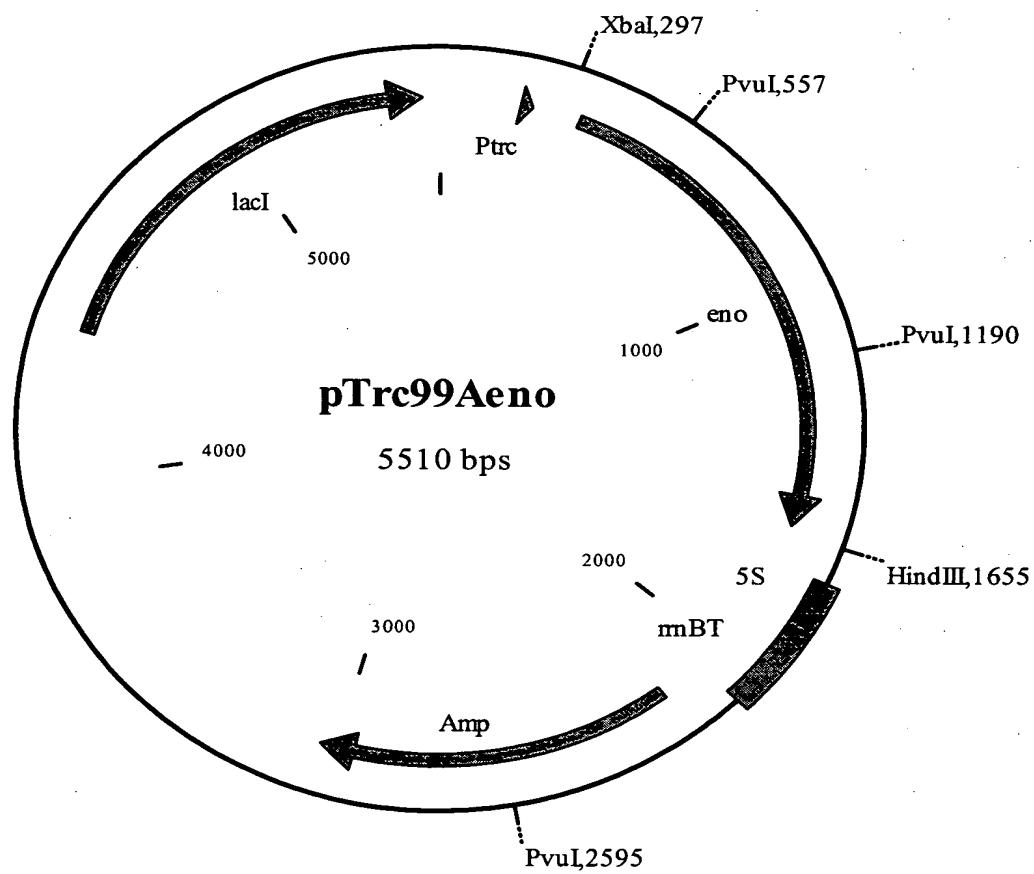
25 9. Mikroorganismen, gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass diese L-Threonin produzieren.

**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, in dem man folgende Schritte durchführt:

- 5 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man das eno-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen oder Allele verstärkt,
- 10 b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
- c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure.

Figur 1: Karte des Plasmides pTrc99Aeno



## SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Degussa AG  
10 <120> Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von  
Stämmen der Familie Enterobacteriaceae  
<130> 020479 BT  
15 <160> 4  
<170> PatentIn version 3.1  
20 <210> 1  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
25  
<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(31)  
30 <223> eno1  
<400> 1  
gtttgtctag agtttcagtt taactagtga c  
35 <210> 2  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
40  
<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(25)  
45 <223> eno2  
<400> 2  
ccggaggctg gcaagcttaa atcag  
50 <210> 3  
<211> 1381  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli  
55  
<220>  
<221> PCR-Produkt  
<222> (1)..(1381)  
60 <223>  
<220>  
<221> CDS

<222> (46)..(1344)  
 <223> eno-Gen

5	<400> 3				57
	gtttgtctag agtttcagtt taactagtga cttgaggaaa accta atg tcc aaa atc	Met	Ser	Lys	Ile
		1			
10	gta aaa atc atc ggt cgt gaa atc atc gac tcc cgt ggt aac ccg act				105
	Val Lys Ile Ile Gly Arg Glu Ile Ile Asp Ser Arg Gly Asn Pro Thr	5	10	15	20
15	gtt gaa gcc gaa gta cat ctg gag ggt ttc gtc ggt atg gca gct				153
	Val Glu Ala Glu Val His Leu Glu Gly Phe Val Gly Met Ala Ala	25	30	35	
20	gct ccg tca ggt gct tct act ggt tcc cgt gaa gct ctg gaa ctg cgc				201
	Ala Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ser Arg Glu Ala Leu Glu Leu Arg	40	45	50	
	gat ggc gac aaa tcc cgt ttc ctg ggt aaa ggc gta acc aaa gct gtt				249
	Asp Gly Asp Lys Ser Arg Phe Leu Gly Lys Gly Val Thr Lys Ala Val	55	60	65	
25	gct gcg gta aac ggc ccg atc gct cag gcg ctg att ggc aaa gat gct				297
	Ala Ala Val Asn Gly Pro Ile Ala Gln Ala Leu Ile Gly Lys Asp Ala	70	75	80	
30	aaa gat cag gct ggc att gac aag atc atg atc gac ctg gac ggc acc				345
	Lys Asp Gln Ala Gly Ile Asp Lys Ile Met Ile Asp Leu Asp Gly Thr	85	90	95	100
35	gaa aac aaa tcc aaa ttc ggc gcg aac gca atc ctg gct gta tct ctg				393
	Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu Ala Val Ser Leu	105	110	115	
40	gct aac gcc aaa gct gct gca gct gct aaa ggt atg ccg ctg tac gag				441
	Ala Asn Ala Lys Ala Ala Ala Lys Gly Met Pro Leu Tyr Glu	120	125	130	
	cac atc gct gaa ctg aac ggt act ccg ggc aaa tac tct atg ccg gtt				489
	His Ile Ala Glu Leu Asn Gly Thr Pro Gly Lys Tyr Ser Met Pro Val	135	140	145	
45	ccg atg atg aac atc atc aac ggt ggt gag cac gct gac aac aac gtt				537
	Pro Met Met Asn Ile Ile Asn Gly Glu His Ala Asp Asn Asn Val	150	155	160	
50	gat atc cag gaa ttc atg att cag ccg gtt ggc gcg aaa act gtg aaa				585
	Asp Ile Gln Glu Phe Met Ile Gln Pro Val Gly Ala Lys Thr Val Lys	165	170	175	180
55	gaa gcc atc cgc atg ggt tct gaa gtt ttc cat cac ctg gca aaa gtt				633
	Glu Ala Ile Arg Met Gly Ser Glu Val Phe His His Leu Ala Lys Val	185	190	195	
60	ctg aaa gcg aaa ggc atg aac act gct gtt ggt gac gaa ggt ggc tat				681
	Leu Lys Ala Lys Gly Met Asn Thr Ala Val Gly Asp Glu Gly Tyr	200	205	210	
	gcg ccg aac ctg ggt tcc aac gct gaa gct ctg gct gtt atc gct gaa				729
	Ala Pro Asn Leu Gly Ser Asn Ala Glu Ala Leu Ala Val Ile Ala Glu	215	220	225	

gct gtt aaa gct gct ggt tat gaa ctg ggc aaa gac atc act ttg gcg Ala Val Lys Ala Ala Gly Tyr Glu Leu Gly Lys Asp Ile Thr Leu Ala 230 235 240	777
5 atg gac tgc gca gct tct gaa ttc tac aaa gat ggt aaa tac gtt ctg Met Asp Cys Ala Ala Ser Glu Phe Tyr Lys Asp Gly Lys Tyr Val Leu 245 250 255 260	825
10 gct ggc gaa ggc aac aaa gcg ttc acc tct gaa gaa ttc act cac ttc Ala Gly Glu Gly Asn Lys Ala Phe Thr Ser Glu Glu Phe Thr His Phe 265 270 275	873
15 ctg gaa gaa ctg acc aaa cag tac ccg atc gtt tct atc gaa gac ggt Leu Glu Leu Thr Lys Gln Tyr Pro Ile Val Ser Ile Glu Asp Gly 280 285 290	921
20 ctg gac gaa tct gac tgg gac ggt ttc gca tac cag acc aaa gtt ctg Leu Asp Glu Ser Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Gln Thr Lys Val Leu 295 300 305	969
25 ggc gac aaa atc cag ctg gtt ggt gac gac ctg ttc gta acc aac acc Gly Asp Lys Ile Gln Leu Val Gly Asp Asp Leu Phe Val Thr Asn Thr 310 315 320	1017
30 atc aaa ttc aac cag atc ggt tct ctg acc gaa act ctg gct gca atc Ile Lys Phe Asn Gln Ile Gly Ser Leu Thr Glu Thr Leu Ala Ala Ile 345 350 355	1113
35 aag atg gcg aaa gat gct ggc tac act gca gtt atc tct cac cgt tct Lys Met Ala Lys Asp Ala Gly Tyr Thr Ala Val Ile Ser His Arg Ser 360 365 370	1161
40 ggc gaa act gaa gac gct acc atc gct gac ctg gct gtt ggt act gct Gly Glu Thr Glu Asp Ala Thr Ile Ala Asp Leu Ala Val Gly Thr Ala 375 380 385	1209
45 gca ggc cag atc aaa act ggt tct atg agc cgt tct gac cgt gtt gct Ala Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ser Met Ser Arg Ser Asp Arg Val Ala 390 395 400	1257
50 ccg tac aac cag ctg att cgt atc gaa gaa gct ctg ggc gaa aaa gca Lys Tyr Asn Gln Leu Ile Arg Ile Glu Ala Leu Gly Glu Lys Ala 405 410 415 420	1305
55 atctgattta agcttgccag cctccgg	1354
55 <210> 4	1381
55 <211> 432	
55 <212> PRT	
55 <213> Escherichia coli	
60 <400> 4	
60 Met Ser Lys Ile Val Lys Ile Ile Gly Arg Glu Ile Ile Asp Ser Arg 1 5 10 15	

Gly Asn Pro Thr Val Glu Ala Glu Val His Leu Glu Gly Gly Phe Val  
 20 25 30

5 Gly Met Ala Ala Ala Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ser Arg Glu Ala  
 35 40 45

Leu Glu Leu Arg Asp Gly Asp Lys Ser Arg Phe Leu Gly Lys Gly Val  
 50 55 60

10 Thr Lys Ala Val Ala Ala Val Asn Gly Pro Ile Ala Gln Ala Leu Ile  
 65 70 75 80

Gly Lys Asp Ala Lys Asp Gln Ala Gly Ile Asp Lys Ile Met Ile Asp  
 15 85 90 95

Leu Asp Gly Thr Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu  
 100 105 110

20 Ala Val Ser Leu Ala Asn Ala Lys Ala Ala Ala Ala Lys Gly Met  
 115 120 125

Pro Leu Tyr Glu His Ile Ala Glu Leu Asn Gly Thr Pro Gly Lys Tyr  
 130 135 140

25 Ser Met Pro Val Pro Met Met Asn Ile Ile Asn Gly Gly Glu His Ala  
 145 150 155 160

Asp Asn Asn Val Asp Ile Gln Glu Phe Met Ile Gln Pro Val Gly Ala  
 30 165 170 175

Lys Thr Val Lys Glu Ala Ile Arg Met Gly Ser Glu Val Phe His His  
 180 185 190

35 Leu Ala Lys Val Leu Lys Ala Lys Gly Met Asn Thr Ala Val Gly Asp  
 195 200 205

Glu Gly Gly Tyr Ala Pro Asn Leu Gly Ser Asn Ala Glu Ala Leu Ala  
 210 215 220

40 Val Ile Ala Glu Ala Val Lys Ala Ala Gly Tyr Glu Leu Gly Lys Asp  
 225 230 235 240

Ile Thr Leu Ala Met Asp Cys Ala Ala Ser Glu Phe Tyr Lys Asp Gly  
 45 245 250 255

Lys Tyr Val Leu Ala Gly Glu Gly Asn Lys Ala Phe Thr Ser Glu Glu  
 260 265 270

50 Phe Thr His Phe Leu Glu Glu Leu Thr Lys Gln Tyr Pro Ile Val Ser  
 275 280 285

Ile Glu Asp Gly Leu Asp Glu Ser Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Gln  
 290 295 300

55 Thr Lys Val Leu Gly Asp Lys Ile Gln Leu Val Gly Asp Asp Leu Phe  
 305 310 315 320

Val Thr Asn Thr Lys Ile Leu Lys Glu Gly Ile Glu Lys Gly Ile Ala  
 60 325 330 335

Asn Ser Ile Leu Ile Lys Phe Asn Gln Ile Gly Ser Leu Thr Glu Thr  
 340 345 350

65 Leu Ala Ala Ile Lys Met Ala Lys Asp Ala Gly Tyr Thr Ala Val Ile  
 355 360 365

Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Ala Thr Ile Ala Asp Leu Ala  
370 375 380

5 Val Gly Thr Ala Ala Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ser Met Ser Arg Ser  
385 390 395 400

Asp Arg Val Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Ile Arg Ile Glu Glu Ala Leu  
405 410 415

10 Gly Glu Lys Ala Pro Tyr Asn Gly Arg Lys Glu Ile Lys Gly Gln Ala  
420 425 430